

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-89249

(43) 公開日 平成8年(1996)4月9日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A			
// C 1 2 N 9/88				
(C 1 2 N 15/09	Z N A	9281-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
			(C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
			審査請求 未請求 請求項の数5	OL (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-234612

(22) 出願日 平成6年(1994)9月29日

(71) 出願人 000005968

三菱化学株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72) 発明者 乾 将行

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72) 発明者 満 朋子

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72) 発明者 小林 幹

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(74) 代理人 弁理士 山本 隆也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ジヒドロキシ酸デヒドラターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片

(57) 【要約】

【構成】 コリネ型細菌由来のジヒドロキシ酸デヒドラターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片。

【効果】 本発明のDNA断片は、生体内においてL-イソロイシン、L-バリンの生合成に関与するジヒドロキシ酸デヒドラターゼをコードするコリネ型細菌由来のDNA断片であり、これらのアミノ酸の製造に利用可能である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 コリネ型細菌由来のジヒドロキシ酸デヒドラターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片。

【請求項2】 コリネ型細菌が***Brevibacterium flavu***

制限酵素	認識部位数
E c o R I	2
B a m H I	0
P s t I	1

【請求項4】 配列表1に示されるアミノ酸配列で表されるジヒドロキシ酸デヒドラターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片。

【請求項5】 配列表1に示されるDNA配列で表されるジヒドロキシ酸デヒドラターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、コリネ型細菌由来のジヒドロキシ酸デヒドラターゼ（E. C. 4. 2. 1. 9）をコードする遺伝子DNAに関する。ジヒドロキシ酸デヒドラターゼは生体内においてL-イソロイシン、L-バリンの生合成に関与しており、これらのアミノ酸の製造に利用可能である。

【0002】

【従来の技術】ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ（E. C. 4. 2. 1. 9）は、イソロイシン及びバリンの生合成遺伝子の一つとして、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）においてよく研究されており〔ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（*Journal of Biological Chemistry*）、261、2441～2450（1986）〕、その他にも、ラクトコッカス・ラクティス（*Lactococcus lactis*）〔ジャーナル・オブ・バクテリオロジー（*Journal of Bacteriology*）174、6580～6589（1992）〕、の一次構造が決定されている。しかしながら、産業上重要な細菌であるコリネ型細菌由来のジヒドロキシ酸デヒドラターゼ（E. C. 4. 2. 1. 9）遺伝子の一次構造について、従来の報告例はない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、コリネ型細菌由来のジヒドロキシ酸デヒドラターゼ（E. C. 4. 2. 1. 9）をコードする遺伝子の提供を目的として成されたものである。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、コリネ型細菌に属するプレビバクテリウム・フラバムMJ-233染色体よりジヒドロキシ酸デヒドラターゼ遺伝子が単離可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。かくし

m) MJ-233である請求項1記載のDNA断片。

【請求項3】 両端にKpnIサイトを有し、大きさが6.0kbであり、下記表に記載する制限酵素で切断した場合、下記表に記載する認識部位数と切断断片の大きさを示す請求項2記載のDNA断片。

切断断片の大きさ（kb）

1. 7、2. 0、2. 3
6. 0
5. 0、1. 0

て、本発明によれば、コリネ型細菌由来のジヒドロキシ酸デヒドラターゼをコードする遺伝子DNA断片が提供される。

【0005】以下、本発明についてさらに詳細に説明する。本発明の「ジヒドロキシ酸デヒドラターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片」とは、2、3-ジヒドロキシ-3-メチル吉草酸から2-ケト-3-メチル吉草酸を合成する酵素、あるいは、2、3-ジヒドロキシイソ吉草酸から2-ケトイソ吉草酸を合成する酵素、すなわちジヒドロキシ酸デヒドラターゼ（E. C. 4. 2. 1. 9）をコードする遺伝子を含むDNA断片を意味する。

【0006】ジヒドロキシ酸デヒドラターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片（以下、これを「A断片」と略称することがある）は、その塩基配列が決定された後は合成することも可能であるが、一般にはジヒドロキシ酸デヒドラターゼ生産性を有する微生物からクローニングすることができ、その供給源となる微生物としては、コリネ型細菌、殊にプレビバクテリウム・フラバム（*Brevibacterium flavum*）MJ-233（FERM BP-1497）およびその由来株が有利に使用される。

【0007】これらの供給源微生物からA断片を調製するための基本的操作の一例を述べれば次のとおりである：A断片は、上記コリネ型細菌、例えばプレビバクテリウム・フラバムMJ-233（FERM BP-1497）株の染色体上に存在し、この染色体を適当な制限酵素で切断することにより生ずる切断断片の中から以下に述べる方法で分離、取得することができる。

【0008】まず、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233株の培養物から染色体DNAを抽出する。この染色体DNAを適当な制限酵素、例えばKpnIを用いて染色体DNAを完全に分解する。得られるDNA断片を、大腸菌における発現ベクター、例えばpUC118（宝酒造製）に挿入し、このベクターを用いてジヒドロキシ酸デヒドラターゼ遺伝子が欠損したイソロイシン及びバリン要求性大腸菌変異株エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）ME5361〔国立遺伝学研究所、遺伝実験生物保存研究センター；〒411、静岡県三島市谷田1111番地保存株であり、同研究所より入手可能。〕を形質転換し、選択培地に塗抹す

ることにより、形質転換株を取得する。得られる形質転換株よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたプレバクテリウム・フラバムMJ-233株染色体由来のA断片を確認・取得することができる。

【0009】かくして得られるA断片をさらに適当な制限酵素を用いて切断し、得られるDNA断片を、大腸菌で複製可能なベクタープラスミドに挿入し、このベクタープラスミドを通常用いられる形質転換法、例えば、塩化カルシウム法、電気パルス法等による形質転換により前記イソロイシン及びバリン要求性大腸菌変異株に導入し、選択培地に塗抹する。

【0010】得られる形質転換体よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより、挿入された

プレバクテリウム・フラバムMJ-233株染色体由来のA断片を確認・取得することができる。このようにして得られるA断片の一つは、上記プレバクテリウム・フラバムMJ-233株の染色体DNAを制限酵素KpnIで切断することによって得られる大きさが約6.0kbのDNA断片を挙げることができる。

【0011】この約6.0kbのジヒドロキシ酸デヒドラターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を、各種の制限酵素で切断したときの認識部位数及び切断断片の大きさを下記第1表に示す。また該DNA断片の制限酵素切断点地図を図1に示す。

【0012】

【表1】

第1表

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
EcoRI	2	1.7、2.0、2.3
BamHI	0	6.0
PstI	1	5.0、1.0

【0013】なお、本明細書において、制限酵素による「認識部位数」は、DNA断片又はプラスミドを、制限酵素の存在下で完全分解し、それらの分解物をそれ自体既知の方法に従い1%アガロースゲル電気泳動および5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、分離可能な断片の数から決定した値を採用した。

【0014】また、「切断断片の大きさ」及びプラスミドの大きさは、アガロースゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのラムダファージ (λ phage) のDNAを制限酵素HindIIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一アガロースゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、また、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのファイ・エックス174ファージ (ϕ x174 phage) のDNAを制限酵素HaeIIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一ポリアクリルアミドゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、切断DNA断片又はプラスミドの各DNA断片の大きさを算出する。プラスミドの大きさは、切断断片それぞれの大きさを加算して求める。なお、各DNA断片の大きさの決定において、1kb以上の断片の大きさについては、1%アガロースゲル電気泳動によって得られる結果を採用し、約0.1kbから1kb未満の断片の大きさについては4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって得られる結果を採用した。

【0015】一方、上記したプレバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAを制限酵素KpnIによって切断することにより得られる大きさが約6.0kbのDNA断片については、その塩基配列をプラスミドpUC118及び/またはpUC119 (宝酒造製) を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法 [dideoxy

chain termination法、Sanger, F. et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)] により決定することができる。このようにして決定した上記約6.0kbのDNA断片の塩基配列のオープンリーディングフレームの存在から決定したジヒドロキシ酸デヒドラターゼをコードする遺伝子は、後記する配列表の配列番号: 1に記載の配列を有するものであり、612個のアミノ酸をコードする1836塩基対から構成されている。

【0016】上記した、後記配列表の配列番号: 1に記載の塩基配列を包含して成る本発明のジヒドロキシ酸デヒドラターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片は、天然のコリネ型細菌染色体DNAから分離されたもののみならず、通常用いられるDNA合成装置、例えばアプライド・バイオシステムズ社製394DNA/RNAシンセサイザーを用いて合成されたものであってもよい。

【0017】また、前記の如くプレバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAから取得される本発明のDNA断片は、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼをコードする機能を実質的に損なうことがない限り、塩基配列の一部の塩基が他の塩基と置換されていてもよく又は削除されていてもよく、或いは新たに塩基が挿入されていてもよく、さらに塩基配列の一部が転位されているものであってもよく、これらの誘導体のいずれもが、本発明のジヒドロキシ酸デヒドラターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片に包含されるものである。

【0018】本発明のジヒドロキシ酸デヒドラターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片 (A断片) は、適当なプラスミドベクター、例えば、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラ

スミドベクターに導入することにより、コリネ型細菌内でジヒドロキシ酸デヒドラターゼの高発現可能な組換えプラスミドを得ることができる。

【0019】また、本発明のジヒドロキシ酸デヒドラターゼをコードする遺伝子を発現させるためのプロモーターは、コリネ型細菌が保有する該遺伝子自身のプロモーターであることができるが、それに限られるものではなく、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ遺伝子の転写を開始させるための原核生物由来の塩基配列であれば、いかなるプロモーターであってもよい。

【0020】本発明のA断片を導入することができる、コリネ型細菌内での複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターとしては、例えば、特開平3-210184号公報に記載のプラスミドpCRY30；特開平2-276575号公報に記載のプラスミドpCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX；特開平1-191686号公報に記載のプラスミドpCRY2及びpCRY3；特開昭58-67679号公報に記載のpAM330；特開昭58-77895号公報に記載のpHM1519；特開昭58-192900号公報に記載のpAJ655、pAJ611及びpAJ1844；特開昭57-134500号に記載のpCG1；特開昭58-35197号公報に記載のpCG2；特開昭57-183799号公報に記載のpCG4及びpCG11等を挙げることができる。

【0021】中でもコリネ型細菌の宿主ベクター系で用いられるプラスミドベクターとしては、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子とコリネ型細菌内でプラスミドの安定化機能を司る遺伝子を有するものが好ましく、例えばプラスミドpCRY30、pCRY21、pCRY2KE、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX等が好適に使用される。

【0022】上記プラスミドベクターpCRY30を調製する方法としては、Brevibacterium stationis (IFO12144 (FERM BP-2515)) からプラスミドpBY503 (このプラスミドの詳細については特開平1-95785号公報参照) DNAを抽出し、制限酵素XhoIで大きさが約4.0kbのプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNA断片 (以下これを「複製領域」と言うことがある。) を切り出し、制限酵素EcoRIおよびKpnIで大きさが約2.1kbのプラスミドの安定化機能を司る遺伝子を含むDNA断片 (以下これを「安定化領域」と言うことがある。) を切り出す。これらの両断片をプラスミドpHSG298 (宝酒造製) のEcoRI、KpnI部位及びSalI部位に組み込むことにより、プラスミドベクターpCRY30を調製することができる。

【0023】次に、上記プラスミドベクターへの本発明のA断片の導入は、例えば、プラスミドベクター中に1個所だけ存在する制限酵素部位を該制限酵素で開裂し、前記A断片および開裂したプラスミドベクターを、必要に応じてS1ヌクレアーゼで処理して平滑末端とするかまたは適当なアダプターDNAの存在下に、DNAリガーゼ処理で連結させることにより行うことができる。

【0024】プラスミドpCRY30への本発明のA断片の導入は、プラスミドpCRY30を制限酵素KpnIで開裂させ、そこに前記ジヒドロキシ酸デヒドラターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片 (A断片) をDNAリガーゼで連結させることにより行うことができる。このようにして造成されるプラスミドpCRY30に本発明の大きさが約6.0kbのA断片を導入した組換えプラスミドを、本発明者らはプラスミドpCRY30-DHと命名した。プラスミドpCRY30-DHの作製方法の詳細については、後記実施例で説明する。

【0025】かくして造成されるジヒドロキシ酸デヒドラターゼをコードする遺伝子を含むコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドを、宿主微生物に導入して該微生物の培養物を用いてL-イソロイシン又はL-バリンを安定に効率よく生産することが可能となる。本発明によるプラスミドで形質転換しうる宿主微生物としては、コリネ型細菌、例えばプレビバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497)、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233-AB-41 (FERM BP-1498)、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233-ABT-11 (FERM BP-1500)、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233-ABD-21 (FERM BP-1499) 等が挙げられる。

【0026】なお、上記のFERM BP-1498の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としてDL- α -アミノ酪酸耐性を積極的に付与されたエタノール資化性微生物である (特公昭59-28398号公報第3~4欄参照)。また、FERM BP-1500の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としたL- α -アミノ酪酸トランスアミナーゼ高活性変異株である (特開昭62-51998号公報参照)。さらに、FERM BP-1499の菌株はFERMBP-1497の菌株を親株としたD- α -アミノ酪酸デアミナーゼ高活性変異株である (特開昭61-177993号公報参照)。

【0027】これらの微生物の他に、プレビバクテリウム・アンモニアゲネス (Brevibacterium ammoniagenes) ATCC6871、同ATCC13745、同ATCC13746；プレビバクテリウム・デバリカタム (Brevibacterium divaricatum) ATCC14020；プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム (Brevi

bacterium lactofermentum) ATCC 13869; コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 31831 等を宿主微生物として用いることもできる。

【0028】なお、宿主としてプレビバクテリウム・フラバム MJ-233 由来の菌株を用いる場合、本菌株が保有するプラスミド pBY502 (特開昭 63-36787 号公報参照) のため、形質転換が困難である場合があるので、そのような場合には、本菌株よりプラスミド pBY502 を除去することが望ましい。そのようなプラスミド pBY502 を除去する方法としては、例えば、継代培養を繰り返すことにより自然に欠失させることも可能であるし、人為的に除去することも可能である [Bact. Rev., 36, 361~405 (1972) 参照]。上記プラスミド pBY502 を人為的に除去する方法の一例を示せば次のとおりである。

【0029】宿主プレビバクテリウム・フラバム MJ-233 の生育を不完全に阻害する濃度のアクリジンオレンジ (濃度: 0.2~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) もしくはエチジウムブロミド (濃度: 0.2~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 等を含む培地に、1 ml 当たり約 10 細胞になるように植菌し、生育を不完全に阻害しながら、約 24 時間約 33℃ で培養する。培養液を希釈後寒天培地に塗布し、約 33℃ で約 2 日培養する。出現したコロニーから各々独立にプラスミド抽出操作を行い、プラスミド pBY502 が除去されている株を選択する。この操作によりプラスミド pBY502 が除去されたプレビバクテリウム・フラバム MJ-233 由来菌株が得られる。

【0030】上記宿主微生物の前記組換えプラスミドによる形質転換は、それ自体既知の方法、例えば Calvin, N. M. and Hanawalt, P. C., Journal of Bacteriology, 170, 2796 (1988); Ito, K., Nishida, T. and Izaki, K., Agricultural and Biological Chemistry, 52, 293 (1988) 等の文献に記載の方法により、例えば宿主微生物にパルス波を通电 [Sato, Y. et al., Journal of Industrial Microbiology, 5, 159 (1990) 参照] することにより行うことができる。

【0031】上記の方法で形質転換して得られるジヒドロキシ酸デヒドラターゼ産生能を有するコリネ型細菌、例えばプレビバクテリウム・フラバム MJ-233 由来株の培養方法を以下に述べる。培養は炭素源、窒素源、無機塩等を含む通常の栄養培地で行うことができ、炭素源としては、例えばグルコース、エタノール、メタノール、廃糖蜜等が、そして窒素源としては、例えばアンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アン

モニウム、尿素等がそれぞれ単独もしくは混合して用いられる。また、無機塩としては、例えばリン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム等が用いられる。この他にペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カザミノ酸、ビオチン等の各種ビタミン等の栄養源を培地に添加することができる。

【0032】培養は、通常、通気攪拌、振盪等の好気条件下に、約 20~約 40℃、好ましくは約 25℃~約 35℃ の温度で行うことができる。培養途中の pH は 5~10、好ましくは 7~8 付近とすることができ、培養中の pH 調整は酸又はアルカリを添加して行うことができる。培養開始時の炭素源濃度は、好ましくは 1~5 容量%、更に好ましくは 2~3 容量% である。また、培養期間は通常 1~7 日間とすることができ、最高期間は 3 日間である。

【0033】このようにして得られる培養物から各々菌体を集めて、水又は適当な緩衝液で洗浄し、L-イソロイシン又は L-バリン生成反応に使用することができる。L-イソロイシン又は L-バリン生成反応においては、これらの菌体をそのまま用いることができ、あるいは超音波処理等を加えた菌体破砕物又はそれから分離された粗酵素もしくは精製酵素として、あるいは適当な担体に固定化して用いることができる。以上に述べた如き菌体の破砕物、粗もしくは精製酵素、固定化物等を本明細書ではまとめて「菌体処理物」という。

【0034】しかして本発明に従えば、上記培養菌体又は菌体処理物の存在下に、少なくとも炭素源と窒素源を含有する水性反応液中にて酵素反応させて L-イソロイシン又は L-バリンを生成せしめることを特徴とする L-イソロイシン又は L-バリンの製造法が提供される。上記の酵素反応は、通常約 20~約 40℃、好ましくは約 25~約 35℃ の範囲で行うことができる。

【0035】水性反応液中に添加することができる炭素源、窒素源は、前記した通常の栄養培地に用いられるものを挙げる事ができる。また該水性反応液には、前記した通常の栄養培地に用いることができる無機塩等を添加することもできる。特に、本発明のプラスミドで形質転換した宿主微生物がビオチン要求性のコリネ型細菌である場合は、上記の如く調製された培養菌体またはその固定化物と、少なくとも炭素源と窒素源とを含有しかつビオチンを含有しない水性反応液中で、酵素反応させて L-イソロイシン又は L-バリンを生成せしめるのが好適である。この場合、ビオチン要求性のコリネ型細菌はビオチンを実質的に含有しない水性反応液中では菌体増殖せずに、該菌体の保有する代謝系において炭素源及び窒素源がエネルギー共役を伴う酵素反応を介して反応せしめられ、L-イソロイシン又は L-バリンが製造される。

【0036】

【実施例】以上に本発明を説明してきたが、下記の実施例によりさらに具体的に説明する。

【0037】実施例1 プレバクテリウム・フラバム MJ-233由来のジヒドロキシ酸デヒドラターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片(A断片)のクローン化

(A) プレバクテリウム・フラバム MJ-233の全DNAの抽出

半合成培地A培地〔組成：尿素2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7g、 K_2HPO_4 0.5g、 KH_2PO_4 0.5g、 MgSO_4 0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$ 6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ビオチン200 μg 、塩酸チアミン200 μg 、グルコース20g、蒸留水1リットル〕1リットルに、プレバクテリウム・フラバム MJ-233 (FERM BP-1497) を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む10mM NaCl-20mM トリス緩衝液 (pH 8.0) -1mM EDTA-2Na 溶液15mlに懸濁した。次にプロテナーゼKを、最終濃度が100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加し、37℃で1時間保温した。さらにドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.5%になるように添加し、50℃で6時間保温して溶菌した。この溶菌液に、等量のフェノール/クロロホルム溶液を添加し、室温で10分間ゆるやかに振盪した後、全量を遠心分離 (5,000 $\times g$ 、20分間、10 \sim 12℃) し、上清画分を分取し、酢酸ナトリウムを0.3Mとなるように添加した後、2倍量のエタノールをゆっくりと加えた。水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス棒でまきとり、70%エタノールで洗浄した後、風乾した。得られたDNAに10mM トリス緩衝液 (pH 7.5) -1mM EDTA-2Na 溶液5mlを加え、4℃で一晩静置し、以後の実験に用いた。

【0038】(B) 組換え体の創製

上記(A)項で得たプレバクテリウム・フラバム MJ-233の全DNA溶液の90 μl を制限酵素KpnI 50unitsを用い、37℃で1時間反応させ完全分解した。このKpnI分解DNAを、クローニングベクターpUC118 (宝酒造より市販) を制限酵素KpnIで切断したものと混合し、50mM トリス緩衝液 (pH 7.6)、10mM ジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl_2 及びT4 DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し (各成分の濃度は最終濃度である)、4℃で15時間反応させ、結合させた。

【0039】(C) ジヒドロキシ酸デヒドラターゼをコードする遺伝子を含むプラスミドの選択

上記遺伝子の選択は、前記大腸菌変異株エシェリヒア・コリME5361を用いて行った。上記(B)項で得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法 [Jou

rnal of Molecular Biology, 53, 159 (1970)] により前記エシェリヒア・コリME5361を形質転換し、アンピシリン50mgを含む選択培地 [K_2HPO_4 7g、 KH_2PO_4 2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g、グルコース20g、ロイシン20mg、チアミン1mg及び寒天16gを蒸留水1リットルに溶解] に塗抹した。

【0040】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素KpnIにより切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpUC118の長さ3.2kbのDNA断片に加え、長さ約6.0kbの挿入DNA断片が認められた。該DNA断片を各種の制限酵素で切断したときの制限酵素認識部位数及び切断断片の大きさは前記第1表に示したとおりであった。このDNA断片の制限酵素切断点地図を図1に示す。

【0041】実施例2 ジヒドロキシ酸デヒドラターゼをコードする遺伝子の塩基配列の決定

実施例1の(C)項で得られたジヒドロキシ酸デヒドラターゼをコードする遺伝子を含む長さ約6.0kbのDNA断片について、その塩基配列をプラスミドpUC118及びpUC119を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法 (dideoxy chain termination法) [Sahger, F. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463 (1977)] により図1に示した戦略図に従って決定した。

【0042】その塩基配列中のオープンリーディングフレームの存在から、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼをコードする遺伝子は、後記配列表の配列番号：1に示す塩基配列を有する612個のアミノ酸をコードする1836の塩基対より構成されていた。

【0043】実施例3 コリネ型細菌内で複製し安定なプラスミドベクターpCRY30の作製

(A) プラスミドpBY503の調製

プラスミドpBY503は、プレバクテリウム・スタチオニスIFO12144 (FERM BP-2515) から分離された分子量約10メガダルトンのプラスミドであり、特開平1-95785号公報に記載のようにして調製した。

【0044】半合成培地A培地〔尿素2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7g、 K_2HPO_4 0.5g、 KH_2PO_4 0.5g、 MgSO_4 0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$ 6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ビチオン200 μg 、塩酸チアミン200 μg 、グルコース20g及び蒸留水1リットル〕1リットルに、プレバクテリウム・スタチオニスIFO12144を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/ml

の濃度にリゾチームを含む緩衝液〔25 mM トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、10 mM の EDTA、50 mM グルコース〕20 ml に懸濁し、37℃で1時間反応させた。反応液にアルカリ-SDS 液〔0.2 N NaOH、1% (W/V) SDS〕40 ml を添加し、緩やかに混和して室温にて15分間静置した。次に、この反応液に酢酸カリウム溶液〔5 M 酢酸カリウム溶液60 ml、酢酸11.5 ml、蒸留水28.5 ml の混合液〕30 ml を添加し、充分混和してから氷水中に15分間静置した。

【0045】溶菌物全量を遠心管に移し、4℃で10分間、15,000×g の遠心分離にかけ、上澄液を得た。これに等量のフェノール-クロロホルム液（フェノール：クロロホルム=1：1 混和液）を加え懸濁した後、遠心管に移し、室温下で5分間、15,000×g の遠心分離にかけ、水層を回収した。水層に2倍量のエタノールを加え、-20℃で1時間静置後、4℃で10分間、15,000×g の遠心分離にかけ、沈澱を回収した。

【0046】沈澱を減圧乾燥後、TE 緩衝液〔トリス10 mM、EDTA 1 mM；HCl にて pH 8.0 に調製〕2 ml に溶解した。溶解液に塩化セシウム溶液〔5 倍濃度の TE 緩衝液100 ml に塩化セシウム170 g を溶解させた液〕15 ml と10 mg/ml エチジウムブロマイド溶液1 ml を加えて、密度を1.392 g/ml に合わせた。この溶液を12℃で42時間、116,000×g の遠心分離を行った。

【0047】プラスミド pBY503 は紫外線照射により遠心管内で下方のバンドとして見出しされる。このバンドを注射器で遠心管の側面から抜きとることにより、プラスミド pBY503 を含む分画液を得た。次いでこの分画液を等量のイソアミルアルコールで4回処理してエチジウムブロマイドを抽出除去し、その後に TE 緩衝液に対して透析を行った。このようにして得られたプラスミド pBY503 を含む透析液に3 M 酢酸ナトリウム溶液を最終濃度30 mM に添加した後、2倍量エタノールを加え、-20℃1時間静置した。この溶液を15,000×g の遠心分離にかけて DNA を沈降させ、プラスミド pBY503 を50 μg 得た。

【0048】(B) プラスミドベクター pCRY30 の作製

プラスミド pHSG298（宝酒造製）0.5 μg に制限酵素 SalI（5 units）を37℃1時間反応させ、プラスミド DNA を完全に分解した。前記（A）項で調製したプラスミド pBY503 の2 μg に制限酵素 XhoI（1 unit）を37℃で30分間反応させ、プラスミド DNA を部分分解した。

【0049】両者のプラスミド DNA 分解物を混合し、制限酵素を不活性化するために65℃で10分間加熱処理した後、該失活溶液中の成分が最終濃度として各々5

0 mM トリス緩衝液 pH 7.6、10 mM MgCl₂、10 mM ジチオスレイトール、1 mM ATP 及び T4 DNA リガーゼ 1 unit になるように各成分を強化し、16℃で15時間保温した。この溶液を用いてエシェリヒア・コリ JM109 コンピテントセル（宝酒造製）を形質転換した。

【0050】形質転換株は30 μg/ml（最終濃度）のカナマイシン、100 μg/ml（最終濃度）の IPTG（イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド）100 μg/ml（最終濃度）の X-gal（5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド）を含む L 培地（トリプトン10 g、酵母エキス5 g、NaCl 5 g 及び蒸留水1リットル、pH 7.2）で37℃にて24時間培養し、生育株として得られた。これらの生育株のうち、白いコロニーで生育してきたものを選択し、各々プラスミドをアルカリ-SDS 法〔T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, Molecular cloning, 90~91 (1982) 参照〕により抽出した。

【0051】その結果、プラスミド pHSG298 の SalI 部位にプラスミド pBY503 由来の約4.0 kb の断片が挿入されたプラスミド pHSG298-ori が得られた。次に同様の方法を用い、前記（A）項で得られたプラスミド pBY503 DNA を制限酵素 KpnI 及び EcoRI にて処理して得られる約2.1 kb の DNA 断片を上記プラスミド pHSG298-ori の KpnI 及び EcoRI 部位にクローニングし、プラスミドベクター pCRY30 を調製した。

【0052】実施例4 プラスミド pCRY30-DH の作製及びコリネ型細菌への導入

実施例1の（C）項で得られたジヒドロキシ酸デヒドラターゼをコードする遺伝子を含むプラスミド5 μg を制限酵素 KpnI を5 units 用い、37℃で1時間反応させ分解したものと、実施例3の（B）項で得られたプラスミド pCRY30 1 μg を制限酵素 KpnI 1 unit を用い、37℃で1時間反応させ分解したものを混合し、50 mM トリス緩衝液（pH 7.6）、10 mM ジチオスレイトール、1 mM ATP、10 mM MgCl₂ および T4 DNA リガーゼ 1 unit の各成分を添加し（各成分の濃度は最終濃度である）、12℃で15時間反応させ結合させた。このプラスミドを用いて、前記方法に従い前記エシェリヒア・コリ ME5361 株を形質転換し、カナマイシン50 μg/ml を含む選択培地〔K₂HPO₄ 7 g、KH₂PO₄ 2 g、(NH₄)₂SO₄ 1 g、MgSO₄・7H₂O 0.1 g、グルコース20 g、ロイシン20 mg、チアミン1 mg 及び寒天16 g を蒸留水1リットルに溶解〕に塗抹した。

【0053】この培地上の生育株を常法により液体培養

し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpCRY30の長さ8.6kbのDNA断片に加え、大きさ6.0kbの挿入DNA断片が認められた。

【0054】上記の如く調製されたプラスミドDNAを、コリネ型細菌へ形質転換した。形質転換は、電気パルス法を用いて次のとおり行った。プレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) プラスミドpBY502除去株を100mlの前記A培地で対数増殖初期まで培養し、ペニシリンGを1ユニット/mlになるように添加して、さらに2時間振盪培養し、遠心分離により菌体を集め、菌体を20mlのバルス用溶液 (272mM Sucrose、7mM KH₂PO₄、1mM MgCl₂ ; pH7.4) にて洗浄

した。さらに菌体を遠心分離して集め、5mlのバルス用溶液に懸濁し、0.75mlの細胞と、前記で得られたプラスミドDNA溶液50μlとを混合し、水中にて20分間静置した。ジーンパルサー (バイオラ社製) を用いて、2500ボルト、25μFDに設定し、パルスを印加後水中に20分間静置した。全量を3mlの前記A培地に移し30℃にて1時間培養後、カナマイシン15μg/ml (最終濃度) を含む前記A寒天培地に植菌し30℃で2~3日間培養した。出現したカナマイシン耐性株より、前記実施例3 (A) 項に記載の方法を用いてプラスミドを得た。このプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の第2表に示す。

【0055】

【表2】

第2表 プラスミドpCRY30-DH

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
EcoRI	3	8.2、4.4、2.0
BamHI	1	14.6
KpnI	2	8.6、6.0

上記制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpCRY30-DHと命名した。

【0056】実施例5 イソロイシン生成の確認

実施例4で作製したプラスミドpCRY30-DHで形質転換されたプレバクテリウム・フラバムMJ-233株を、白金耳にて10mlの前記A培地 (但し、グルコースの代わりに2%エタノールを添加) に植菌し、30~33℃で12~16時間振盪培養 (前培養) した。次にA培地 (但し、グルコースの代わりに2%エタノールを添加) 100mlに前培養液を2%植菌し、33℃で16時間振盪して対数増殖後期まで培養した。この培養液を遠心分離 (3,500×g、15分間) し、菌体

を集めた後、下記反応液で1回洗浄した。

【0057】得られた菌体を0.5g/mlの濃度になるよう下記反応液に懸濁し、菌体と同量のグラスビーズを添加し氷水中で超音波処理 (power 6、50%パルス2.5min×4回) して細胞を破碎した。この細胞破碎物を遠心分離 (8000rpm 60分間) し、上清を粗酵素液とした。該粗酵素液500μlと下記の組成の反応液500μlを混合し、33℃で2.5時間酵素反応を行った。

【0058】

【表3】

第3表 反応液

100mM	リン酸カリウムバッファー (pH7.2)
100mM	ビルビン酸ナトリウム
50mM	α-ケト酪酸
100mM	L-グルタミン酸ナトリウム
100mM	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
23g/l	硫酸アンモニウム
0.2mM	チアミンニリン酸
10mg/l	フラビンアデニンジヌクレオチド
0.25mM	ビリドキサル5'-リン酸
10mM	塩化マグネシウム

【0059】2.5時間後、100℃2minの熱処理により反応を停止させた後反応液を遠心分離 (12,000×g 15分間) し、上清中のイソロイシン生成量を薄層クロマトグラフィーにて測定した。同様にして、プレバクテリウム・フラバムMJ-233野性株についてもイソロイシン生成量を測定した。その結果を第4表に記載する。

【0060】

【表4】

第4表 イソロイシン生成量

形質転換株	20mM
野性株	10mM

【0061】

【発明の効果】本発明により提供されるジヒドロキシ酸

デヒドラターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を用いて、コリネ型細菌を育種改良することにより、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ高産生株あるいはイソロイシン、バリン高産生株の取得が可能となる。

【0062】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1836

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：プレビバクテリウム・フラバム

株名：MJ-233

配列の特徴：

特徴を表す記号：CDS

存在位置：1-1836

特徴を決定した方法：E

配列

ATG ATC CCA CTT CGT TCA AAA GTC ACC ACC GTC GGT CGC AAT GCA GCT	48
Met Ile Pro Leu Arg Ser Lys Val Thr Thr Val Gly Arg Asn Ala Ala	
1 5 10 15	
GGC GCT CGC GCC CTT TGG CGT GCC ACC GGC ACA AAG GAA AAT GAG TTC	96
Gly Ala Arg Ala Leu Trp Arg Ala Thr Gly Thr Lys Glu Asn Glu Phe	
20 25 30	
GGC AAG CCA ATT GTT GCC ATC GTG AAC TCC TAC ACC CAG TTC GTG CCC	144
Gly Lys Pro Ile Val Ala Ile Val Asn Ser Tyr Thr Gln Phe Val Pro	
35 40 45	
GGA CAC GTT CAC CTT AAG AAC GTC GGC GAT ATT GTG GCA GAT GCA GTG	192
Gly His Val His Leu Lys Asn Val Gly Asp Ile Val Ala Asp Ala Val	
50 55 60	
CGC AAA GCC GGT GGC GTT CCA AAA GAA TTC AAC ACC ATC GCC GTC GAT	240
Arg Lys Ala Gly Gly Val Pro Lys Glu Phe Asn Thr Ile Ala Val Asp	
65 70 75 80	
GAC GGC ATC GCC ATG GGA CAC GGC GGC ATG CTG TAC TCC CTG CCA TCC	288
Asp Gly Ile Ala Met Gly His Gly Gly Met Leu Tyr Ser Leu Pro Ser	
85 90 95	
CGT GAA ATC ATC GCC GAC TCC GTC GAA TAC ATG GTC AAC GCA CAC ACC	336
Arg Glu Ile Ile Ala Asp Ser Val Glu Tyr Met Val Asn Ala His Thr	
100 105 110	
GCC GAC GCC ATG GTG TGT ATC TCC AAC TGT GAC AAG ATC ACC CCA GGC	384
Ala Asp Ala Met Val Cys Ile Ser Asn Cys Asp Lys Ile Thr Pro Gly	
115 120 125	
ATG CTC AAC GCA GCA ATG CGC CTG AAC ATC CCA GTG GTC TTC GTT TCC	432
Met Leu Asn Ala Ala Met Arg Leu Asn Ile Pro Val Val Phe Val Ser	
130 135 140	
GGT GGC CCA ATG GAA GCT GGC AAG GCT GTC GTC GTT GAC GGC GTT GCA	480
Gly Gly Pro Met Glu Ala Gly Lys Ala Val Val Val Asp Gly Val Ala	
145 150 155 160	
CAC GCA CCA ACC GAC CTC ATC ACC GCG ATC TCC GCA TCC GCA AGC GAT	528
His Ala Pro Thr Asp Leu Ile Thr Ala Ile Ser Ala Ser Ala Ser Asp	
165 170 175	
GCA GTC GAC GAC GCA GGC CTT GCA GCC GTT GAA GCA TCC GCA TGC CCA	576
Ala Val Asp Asp Ala Gly Leu Ala Ala Val Glu Ala Ser Ala Cys Pro	
180 185 190	
ACC TGT GGC TCC TGC TCC GGT ATG TTC ACC GCG AAC TCC ATG AAC TGC	624
Thr Cys Gly Ser Cys Ser Gly Met Phe Thr Ala Asn Ser Met Asn Cys	
195 200 205	

CTC ACC GAA GCT CTG GGA CTT TCT CTC CCA GGC AAC GGC TCC ACC CTG 672
 Leu Thr Glu Ala Leu Gly Leu Ser Leu Pro Gly Asn Gly Ser Thr Leu
 210 215 220
 GCA ACC CAC GCA GCA CGT CGC GCA CTG TTT GAA AAG GCC GGC GAA ACC 720
 Ala Thr His Ala Ala Arg Arg Ala Leu Phe Glu Lys Ala Gly Glu Thr
 225 230 235 240
 GTC GTT GAA CTG TGC CGC CGC TAC TAC GGT GAA GAA GAC GAA TCC GTT 768
 Val Val Glu Leu Cys Arg Arg Tyr Tyr Gly Glu Glu Asp Glu Ser Val
 245 250 255
 CTG CCA CGT GGC ATT GCC ACC AAG AAG GCA TTC GAA AAC GCA ATG GCA 816
 Leu Pro Arg Gly Ile Ala Thr Lys Lys Ala Phe Glu Asn Ala Met Ala
 260 265 270
 CTG GAT ATG GCC ATG GGT GGA TCC ACC AAC ACC ATC CTC CAC ATC CTC 864
 Leu Asp Met Ala Met Gly Gly Ser Thr Asn Thr Ile Leu His Ile Leu
 275 280 285
 GCA GCT GCC CAG GAA GGC GAA GTT GAC TTC GAC CTC GCA GAC ATC GAC 912
 Ala Ala Ala Gln Glu Gly Glu Val Asp Phe Asp Leu Ala Asp Ile Asp
 290 295 300
 GAA CTG TCC AAA AAC GTC CCC TGC CTG TCC AAG GTT GCA CCA AAC TCC 960
 Glu Leu Ser Lys Asn Val Pro Cys Leu Ser Lys Val Ala Pro Asn Ser
 305 310 315 320
 GAC TAC CAC ATG GAA GAC GTC CAC CGC GCC GGT GGC ATT CCA GCA CTG 1008
 Asp Tyr His Met Glu Asp Val His Arg Ala Gly Gly Ile Pro Ala Leu
 325 330 335
 CTC GGC GAG CTC AAC CGC GGT GGC CTG CTG AAT AAG GAC GTC CAC TCC 1056
 Leu Gly Glu Leu Asn Arg Gly Gly Leu Leu Asn Lys Asp Val His Ser
 340 345 350
 GTT CAC TCC AAC GAC CTT GAA GGT TGG TTG GAT GAC TGG GAT ATC CGC 1104
 Val His Ser Asn Asp Leu Glu Gly Trp Leu Asp Asp Trp Asp Ile Arg
 355 360 365
 TCT GGC AAG ACC ACC GAA GTA GCA ACC GAA CTC TTC CAC GCA GCC CCA 1152
 Ser Gly Lys Thr Thr Glu Val Ala Thr Glu Leu Phe His Ala Ala Pro
 370 375 380
 GGT GGC ATC CGC ACC ACC GAA GCA TTC TCC ACC GAG AAC CGC TGG GAC 1200
 Gly Gly Ile Arg Thr Thr Glu Ala Phe Ser Thr Glu Asn Arg Trp Asp
 385 390 395 400
 GAA CTC GAC ACC GAC GCT GCC AAG GGC TGC ATC CGC GAC GTT GAA CAC 1248
 Glu Leu Asp Thr Asp Ala Ala Lys Gly Cys Ile Arg Asp Val Glu His
 405 410 415
 GCC TAC ACC GAC GGC GGC CTG GTT GTT CTT CGC GGC AAC ATC TCC CCT 1296
 Ala Tyr Thr Asp Gly Gly Leu Val Val Leu Arg Gly Asn Ile Ser Pro
 420 425 430
 GAC GGC GCA GTG ATC AAG TCC GCA GGT ATC GAA GAA GAG CTG TGG AAC 1344
 Asp Gly Ala Val Ile Lys Ser Ala Gly Ile Glu Glu Glu Leu Trp Asn
 435 440 445
 TTC ACC GGA CCA GCA CGA GTT GTC GAA AGC CAG GAA GAG GCA GTC TCT 1392
 Phe Thr Gly Pro Ala Arg Val Val Glu Ser Gln Glu Glu Ala Val Ser
 450 455 460
 GTC ATC CTG ACC AAG ACC ATC CAA GCT GGC GAA GTT CTG GTC GTC CGC 1440
 Val Ile Leu Thr Lys Thr Ile Gln Ala Gly Glu Val Leu Val Val Arg

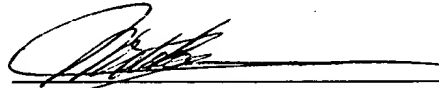

(72)発明者 湯川 英明
茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号
三菱油化株式会社筑波総合研究所内

Pacific Ring Services, Inc.

Affidavit

I, Motoko Yuasa, hereby certify that I am a qualified Japanese-English translator and I am fully familiar with the Japanese and English languages and that the attached translation of Japanese unexamined patent application publication (Kokai) No. H08-089249 is to the best of my knowledge an accurate and complete translation of the copy before me in the Japanese language.

September 8, 2004


Motoko Yuasa (Patent Agent/Translator)
CECELIA A. ROSS
NOTARY PUBLIC - DELAWARE
My Commission Expires Jan. 5, 2005

TRANSLATION



- (19) Japanese Patent Office (JP)
 (12) Japanese Patent Official Gazette (A)
 (11) Patent Publication No.: H08-089249
 (43) Date of Publication: April 9, 1996

(51) Int. Cl ⁶	Symbol	Office File No.	FI	Technical Description
C 12 N 15/09	ZNA			
// C 12 N 9/88				
(C 12 N 15/09	ZNA			
		9281-4B	C 12 N 15/00	ZNA A
			(C 12 N 15/00	ZNA A
C 12 R 1:13				
(C12 N 9/88				
C 12 R 1:13				

Examination Required?: No.

No. of Claims: 5 OL (Total of 12 pages)

-
- (21) Application No.: H06-234612
 (22) Date of Filing: September 29, 1994
 (71) Applicant: 000005968
 (72) Inventor: Masayuki Inui
 c/o Mitsubishi Chemical Corporation
 5-2, Marunouchi 2-Chome, Chiyoda, Tokyo, Japan
 (72) Inventor: Tomoko Man
 c/o Mitsubishi Yuka Kabushiki Kaisha
 Tsukuba Sogo Research Institute
 3-1, Chuo 8-Chome, Ami-Cho, Inashiki, Ibaraki, Japan
 (72) Inventor: Miki Kobayasi
 c/o Mitsubishi Yuka Kabushiki Kaisha
 Tsukuba Sogo Research Institute
 3-1, Chuo 8-Chome, Ami-Cho, Inashiki, Ibaraki, Japan

(72) Inventor: Hideaki Yukawa
c/o Mitsubishi Yuka Kabushiki Kaisha
Tsukuba Sogo Research Institute
3-1, Chuo 8-Chome, Ami-Cho, Inashiki, Ibaraki, Japan

(74) Agent: Takanari Yamamoto, Patent Attorney

(54) TITLE OF THE INVENTION:

**DNA FRAGMENT CONTAINING THE GENE ENCODING FOR DIHYDROXY-
ACID DEHYDRATASE**

CONSTITUTION

A DNA fragment containing the gene for encoding dihydroxy-acid dehydratase derived from a Coryneform bacterium.

EFFECTS OF THE INVENTION

The DNA fragment of the present invention is derived from a Coryneform bacterium which encodes for dihydroxy-acid dehydratase and is associated with the biosynthesis of L-isoleucine and L-valine in a living body and therefore can be utilized in these amino acid production.

WHAT IS CLAIMED IS:

(Claim 1) A DNA fragment containing the gene that encodes for dihydroxy-acid dehydratase derived from a Coryneform bacterium.

(Claim 2) The DNA fragment as set forth in Claim 1 wherein said Coryneform bacterium is *Brevibacterium flavum* MJ233.

(Claim 3) The DNA fragment as set forth in Claim 2 wherein said DNA fragment has the KpnI restriction sites on both ends and has 6.0 kb wherein said DNA fragment can be cut with each restriction enzyme listed in the table below at the number of recognition sites to give the fragment sizes listed in said table.

(Claim 4) A DNA fragment containing the gene that encodes for dihydroxy-acid dehydratase expressed by the amino acid sequence as shown in Sequence Table 1.

(Claim 5) A DNA fragment containing the gene that encodes for dihydroxy-acid dehydratase expressed by the DNA sequence as shown in Sequence Table 1.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

0001

TECHNICAL FIELD

The present invention relates to the DNA gene that encodes for dihydroxy-acid dehydratase (EC 4.2.1.9) derived from a Coryneform bacterium. Dihydroxy-acid dehydratase is associated with the biosynthesis of L-isoleucine and L-valine in a living body and therefore can be utilized in amino acid production.

0002

RELATED ART

Dihydroxy-acid dehydratase, one of the genes for the biosynthesis of isoleucine and valine, has been studied substantially utilizing *Escherichia coli* as disclosed in the Journal of Biological Chemistry, 261, 2441-2450, 1986. The primary structure of dihydroxy-acid dehydratase from *Lactococcus lactis* was also determined, and reported in the Journal of Bacteriology, 174, 6580-6589, 1992. However, no report has been made with respect to the primary structure of the dihydroxy-acid dehydratase (EC 4.2.1.9) gene derived from a Coryneform bacterium, which is an industrially important bacterium.

0003

PROBLEM TO BE SOLVED

The objective of the present invention is to provide a gene that encodes for dihydroxy-acid dehydratase (EC 4.2.1.9) derived from a Coryneform bacterium.

0004

MEANS TO SOLVE THE PROBLEM

The inventors carefully studied ways to achieve the objective and found that the dihydroxy-acid dehydratase gene can be isolated from the *Brevibacterium flavum* MJ233 chromosome of Coryneform bacteria, thus completing the present invention. The present invention can provide a DNA fragment of the gene that encodes for the dihydroxy-acid dehydratase derived from a Coryneform bacterium.

0005

The present invention is described herein in further detail. The "DNA fragment containing the gene that encodes for dihydroxy-acid dehydratase" means that the DNA fragment containing the gene that encodes for the dihydroxy-acid dehydratase (EC

4.2.1.9) that synthesizes 2-keto-3-methylvaleric acid from 2, 3-dihydroxy-3-methylvaleric acid or that synthesizes 2-ketoisovaleric acid from 2, 3-dihydroxyisovaleric acid.

0006

The DNA fragment containing the gene that encodes for dihydroxy-acid dehydratase (occasionally referred to as the "fragment A" hereinafter) can be synthesized provided that the base sequence is determined. Nevertheless, fragment A is generally cloned in a microorganism capable of producing dihydroxy-acid dehydratase.

Advantageous source microorganisms are Coryneform bacteria, more specifically, *Brevibacterium flavum* MJ233 (FERM BP-1497) and derivative strains thereof.

0007

An example of the basic operations required for preparing fragment A from the source microorganism is as follows: fragment A exists on the chromosome of the above Coryneform bacterium, for example, *Brevibacterium flavum* MJ233 (FERM BP-1497). Therefore, fragment A can be isolated or obtained from the cut fragment prepared by digesting the chromosome thereof with an appropriate restriction enzyme in the following manner:

0008

First of all, the chromosomal DNA is extracted from colonies of the *Brevibacterium flavum* MJ233 strain. Next, the chromosomal DNA is completely digested with an appropriate restriction enzyme such as KpnI. The resulting DNA fragments are then inserted into an expression-vector, for example, pUC 118 for *Escherichia coli* manufactured by Takara Shuzo Co., Ltd., to transform the ME 5361 therein, wherein ME 5361 is an isoleucine- and valine-requiring mutant strain without the dihydroxy-acid dehydratase gene. This strain is available at the Genetic Trial Organism Depository and Research Center of the National Institute of Genetics, located at 1111 Tanida, Mishima City, Shizuoka, 411, Japan, where it is deposited. The vectors are inoculated into a selective agar so as to obtain a transfected strain. Then, the plasmid DNA is extracted from the transfected strain thus obtained, and the DNA is analyzed utilizing a restriction enzyme. This is done to confirm whether the fragment A that is

derived from the *Brevibacterium flavum* MJ233 chromosome has been inserted into the plasmid vectors.

0009

The fragment A thus obtained is further digested with an appropriate restriction enzyme. The resulting DNA fragments are then inserted into plasmid vectors that are capable of replicating the DNA fragments in *Escherichia coli*. The plasmid vectors are introduced into the above described isoleucine- and valine-requiring mutant strain of *Escherichia coli* by any normal transformation induction such as the calcium chloride method, the electric pulsation method, or the like. The transformed bacterium is then inoculated into a selective medium.

0010

The plasmid DNA is extracted from the cells containing copies of the recombinant plasmid and is analyzed with a restriction enzyme. The presence of fragment A derived from the *Brevibacterium flavum* MJ233 strain chromosome inserted to the plasmid vector is thus confirmed. One type of the fragment A thus obtained has about 6.0 kb wherein this fragment A is produced by digesting the above *Brevibacterium flavum* MJ233 chromosome strain with KpnI restriction enzyme.

0011

Listed in Table 1 below are the number of recognition sites and sizes of the fragments obtained as a result of cutting the DNA fragment containing the gene that encodes the dihydroxy-acid dehydratase with various restriction enzymes. In addition, Figure 1 is a restriction map of the DNA fragment.

0012

TABLE 1

Restriction Enzyme	No. of Recognition Sites	Fragment Size (kb)
EcoRI	2	1.7, 2.0, 2.3
BamHI	0	6.0
PstI	1	5.0, 1.0

0013

Note that in this specification, the “number of recognition sites” recognized by the restriction enzyme is the number of fragments that can be separated by the step of completely digesting the DNA fragments or plasmids in the presence of a restriction enzyme and the step of separating the cleavage products by gel electrophoresis utilizing 1% agarose and 5% polyacrylamide gels.

0014

Also, the size of the “[DNA] fragment” and the size of the plasmid are determined in the following manner: if agarose-gel electrophoresis is selected, the size of each DNA fragment is computed on the basis of a standard curve plotting the distance that a DNA fragment of known molecular weight travels on the same agarose gel, wherein the DNA fragment of known molecular weight is obtained by digesting the DNA of the λ phage in *Escherichia coli* with the Hind III restriction enzyme; if polyacrylamide-gel electrophoresis is selected, the size of each DNA fragment is computed on the basis of a standard curve plotting the distance that a DNA fragment of known molecular weight travels on the same polyacrylamide gel, wherein the DNA fragment of known molecular weight is obtained by digesting the Φ x-174 phage in *Escherichia coli* with the Hae III restriction enzyme. The size of the plasmid is the sum of each fragment size. Note that in determining the size of each DNA fragment, a size of 1 kb or larger is obtained by using the results from the 1% agarose-gel electrophoresis, and a fragment size within a range of about 0.1~1 kb is obtained by using the results of the 4% polyacrylamide-gel electrophoresis.

0015

On the other hand, with respect to the DNA fragment of about 6.0 kb obtained by digesting the *Brevibacterium flavum* MJ233 chromosome DNA with KpnI restriction enzyme, the base sequence thereof can be determined by the dideoxy chain termination method proposed by Sanger, F. et. al, disclosed in the Proceedings of National Academy of Sciences, USA, 74, 5463, 1977. The gene that encodes for the dihydroxy-acid dehydratase is determined by utilizing the presence of the open reading frame which reads the base sequence of the DNA fragment of about 6.0 kb identified by the previously described manner: The gene has the sequence listed as Sequence Number 1 in the

sequence table described later and is constructed from 1836 base pairs encoding 612 amino acids.

0016

The DNA fragment containing the gene that encodes for the dihydroxy-acid dehydratase of the present invention containing the base sequence listed with Sequence Number 1 in the sequence table which is described later, may be the one isolated from the natural *Corynebacterium flavum* MJ233 chromosomal DNA. Alternatively, it may be the one synthesized by a DNA synthesizer, the example usually selected being the 394 DNA/RNA Synthesizer manufactured by Applied Biosystems Company.

0017

The DNA fragment of the present invention thus obtained from the *Brevibacterium flavum* MJ233 chromosomal DNA may have the following sequence [modifications] as long as the DNA fragment does not substantially deteriorate the dihydroxy-acid dehydratase encoding: a portion of the bases constructing the DNA fragment may be replaced with other bases or may be deleted; new bases may be inserted into the DNA fragment; a portion of the base sequence thereof may be translocated. The DNA fragment containing the gene that encodes for the dihydroxy-acid dehydratase of the present invention includes any of these derivatives.

0018

If the DNA fragment or fragment A containing the gene that encodes the dihydroxy-acid dehydratase of this invention is introduced into an appropriate plasmid vector, for example, the plasmid vector that contains at least the gene that regulates replication and proliferation thereof in the Coryneform bacterium, the recombinant plasmid can substantially express dihydroxy-acid dehydratase in a Coryneform bacterium.

0019

The promoter that expresses the gene that encodes for the dihydroxy-acid dehydratase of the present invention can be the promoter of the gene itself, which the Coryneform bacterium possesses. However, it is not limited to this, and any promoter can be selected as long as the promoter has the base sequence, derived from a prokaryote, which is required for starting transcription of the dihydroxy-acid dehydratase gene.

0020

Plasmid vectors that contain at least the gene regulating replication and proliferation in the Coryneform bacterium and that introduces the fragment A include the following: pCRY 30 that was disclosed in Japanese unexamined patent application publication (Kokai) No. H03-210184; pCRY 21, pCRY 2KE, pCRY 2KX, pCRY 31, pCRY 3KE, and pCRY 3KX that are disclosed in Japanese unexamined patent application publication No. H02-276575; pCRY2 and pCRY3 that are disclosed in Japanese unexamined patent application publication No. H01-191686; pAM 330 that is disclosed in Japanese unexamined patent application publication No. S58-67679; pHM 1519 that is disclosed in Japanese unexamined patent application publication No. S58-77895; pAJ 655, pAJ 611, and pAJ 1844 that are disclosed in Japanese unexamined patent application publication No. S58-192900; pCG 1 that is disclosed in Japanese unexamined patent application publication No. S57-134500; pCG 2 that is disclosed in Japanese unexamined patent application publication No. S58-35197; pCG 4 and pCG 11 that are disclosed in Japanese unexamined patent application publication No. S57-183799, and the like.

0021

A preferable host vector system for the Coryneform bacteria should have one gene regulating replication and proliferation of the plasmids in the Coryneform bacteria and another gene regulating stabilization of the plasmids therein. Examples of preferable plasmids include pCRY 30, pCRY 21, pCRY 2KE, pCRY 2KE [the original text is redundant], pCRY 2KX, pCRY 31, pCRY 3KE and pCRY 3KX, and the like.

0022

Methods of preparing the above plasmid vectors have steps comprising: extraction of the pBY 503 (See Japanese unexamined patent application publication No. H01-95785) from *Brevibacterium stationis* IFO 12144 (FERM BP-2515); cutting a DNA fragment of about 4.0 kb (hereinafter referred to as the “replication domain”) containing the gene regulating the replication and proliferation of the plasmid with XhoI restriction enzyme; and cutting another DNA fragment of about 2.1 kb (hereinafter referred to as the “stabilization domain”) containing the gene regulating stabilization of the plasmid with EcoRI and KpnI restriction enzymes.

The plasmid vector pCRY 30 is prepared by integrating these fragments at the EcoRI site, KpnI site, and salI site of the pHSG 298 plasmid manufactured by Takara Shuzo Co., Ltd.

0023

A fragment A of the present invention can be introduced to the above plasmid vector in the following manner, for example: cleaving a single restriction site that exists in the plasmid vector with the restriction enzyme; and treating the fragment A and the cleaved plasmid vector with SI nuclease on an as needed basis to form blunt ends, or treating the fragment A and the cleaved plasmid vector with a DNA ligase in the presence of an appropriate adaptor to ligate them.

0024

A fragment A of the present invention can be introduced to the pCRY 30 plasmid vector in the following manner: cleaving the pCRY 30 plasmid with KpnI restriction enzyme; and ligating the DNA fragment (fragment A) containing the gene that encodes the dihydroxy-acid dehydratase with a DNA ligase. The inventors named the recombinant plasmid having the fragment A of about 6.0 kb as the pCRY 30-DH plasmid. The method of preparing the pCRY 30-DH plasmid is described in detail later.

0025

The plasmid thus produced, which contains the gene that encodes for dihydroxy-acid dehydratase and can be replicated and proliferated in Coryneform bacteria, may be introduced to a host microorganism to take advantage of colonies of bacterial clones. Hence, L-isoleucine or L-valine can be produced stably and efficiently. Host microorganisms that can be transfected with the plasmid of the present invention include Coryneform bacteria such as *Brevibacterium flavum* MJ233 (FERM BP-1497), *Brevibacterium flavum* MJ233-AB-41 (FERM BP-1498), *Brevibacterium flavum* MJ233-ABT-11 (FERM BP-1500), *Brevibacterium flavum* MJ233-ABD-21 (FERM BP-1499), and the like.

0026

Note that the FERM BP-1498 strain, that has the FERM BP-1497 strain as its parent and is given an aggressive resistance against DL- α -aminobutyric acid, produces a microorganism that can utilize ethanol (Columns 3 ~ 4, Japanese examined patent

application publication (Kokoku) No. S59-28398). The FERM BP-1500 strain, whose parent is FERM BP-1497, has a highly active mutant strain of L- α -aminobutyrate transaminase (Japanese unexamined patent application publication No. S62-51998). The FERM BP-1499 strain, whose parent is FERM BP-1497, has a highly active mutant strain of D- α -aminobutyrate deaminase (Japanese unexamined patent application publication No. S61-177993).

0027

Besides the above microorganisms, host microorganisms such as *Brevibacterium ammoniagenes* of ATCC 6871, ATCC 13745, and ATCC 13746; *Brevibacterium divaricatum* ATCC 14020; *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 31831, and the like can be used as well.

0028

If a strain derived from *Brevibacterium flavum* MJ233 is selected for a host, the presence of the pBY 502 plasmid thereof, which is disclosed in Japanese unexamined patent application publication No. S63-36787, makes transformation difficult. Therefore, it is desirable that the pBY 502 plasmid be removed therefrom. The pBY 502 plasmid may be removed, for example, by subculturing until it disappears naturally. Alternatively, it may be artificially removed in the manner as disclosed in the Bact. Rev., 36, 361 ~ 405, 1972. An example of artificial removal of the pBY 502 plasmid is described below.

0029

The host, *Brevibacterium flavum* MJ233, is inoculated at about 10 cells/mL on a medium containing acridine orange at a concentration of 0.2~50 μ g/mL or ethidium bromide at a concentration of 0.2~50 μ g/mL to maintain the concentration at a level that does not completely inhibit the growth of the host. The culture medium is then incubated at about 33 °C for about 24 hours while incompletely inhibiting the growth of the host. The culture medium is next diluted and inoculated into an agar culture, followed by incubation at about 33 °C for about two days. A plasmid is extracted from each colony independently. The strain from which the pBY 502 plasmid has been removed is thus selected. The strain without the pBY 502 plasmid derived from *Brevibacterium flavum* MJ233 is obtained in this way.

0030

A host organism can be transformed by utilizing a recombinant plasmid prepared by any one of the known methods, for example, the method described in publications disclosed by Calvin, N. M., and Hanawalt, P.C. in the Journal of Bacteriology, 170, 2796, 1988; or the method disclosed by Ito, K., Nishida, T., and Izaki, K. in Agricultural and Biological Chemistry, 52, 293, 1988; or for example, by conducting an electric pulse through a host bacterium (See Satoh, Y., et al., Journal of Industrial Microbiology, 5, 159, 1990).

0031

The method of cultivating *Brevibacterium flavum* MJ233, which is the strain with the dihydroxy-acid dehydratase-producing capability derived from a Coryneform bacterium through the above transformation, is described herein. The culture medium may be any nutrient culture medium containing a carbon source, a nitrogen source, an inorganic salt, and the like. The carbon source may be, for example, glucose, ethanol, methanol, molasses, or the like. The nitrogen source may be, for example, ammonia, ammonium sulfate, ammonium chloride, ammonium nitrate, urea, or the like. The inorganic salt may be, for example, potassium phosphate, dibasic, potassium dihydrogen phosphate, magnesium sulfate, or the like. In addition, nutrients such as various vitamins represented by peptone, meat extract, yeast extract, cornsteep liquor, casamino acids, biotin, or the like may be added to the culture medium as well.

0032

Usually, incubation is carried out under aerobic conditions utilizing aeration stirring, shaking, or the like at about 20~40 °C, more preferably at about 25~35 °C. The pH during incubation can be 5~10, more preferably in the neighborhood of 7~8, and can be adjusted by adding acid or alkali to the medium. A preferable carbon source concentration at the time of initial incubation is 1~5 volume %, more preferably, 2~3 volume %. A usual incubation duration can be as long as 1~7 days, more preferably [typo, "saiko"] 3 days.

0033

The cells that are collected from each of the colonies thus obtained and washed with water or an appropriate buffer, can be used as is in the production of L-isoleucine or L-valine. Alternatively, these cells may be lysed utilizing ultrasound, or may be used as a

crude enzyme or purified enzyme. These cells may also be fixed onto an appropriate carrier. The lysate, crude or purified enzyme, or fixed cells are collectively called "processed cell product" in this specification.

0034

The present invention provides a method of producing L-isoleucine or L-valine wherein the reaction with an enzyme that occurs in the presence of the above incubated cell lines or processed cell products in an aqueous reaction mixture containing a carbon source and nitrogen source. Usually, the above enzyme reaction can be carried out within a range of about 20~40 °C, more preferably within a range of about 25~35°C.

0035

Any carbon source and nitrogen source that are usually selected for nutrient media may be added to the aqueous reaction mixture. In addition, any inorganic salt or the like that can be used for a regular nutrient medium may be added to the above aqueous reaction mixture. Particularly, if the host microorganism capable of carrying out transformation in the presence of the plasmid of the present invention is the biotin-requiring Coryneform bacterium, it is preferable that L-isoleucine or L-valine is produced in the aqueous reaction mixture that contains the cells, or the cell product to which the cells are fixed in the manner described above, a carbon source and nitrogen source at a minimum, but the aqueous reaction mixture should not contain biotin to cause required reaction in the presence of an enzyme therein. In this case, the biotin-requiring Coryneform bacteria will not grow in the aqueous reaction mixture in which biotin is substantially absent. Nevertheless, L-isoleucine or L-valine is still produced because the carbon source or nitrogen source causes energy coupling in the metabolic system of the cell being catalyzed by an enzyme.

EMBODIMENTS

The present invention described above will be described in detail with reference to the embodiments below.

0037

EMBODIMENT 1 CLONING OF A DNA FRAGMENT (FRAGMENT A) CONTAINING THE GENE ENCODING FOR DIHYDROXY-ACID DEHYDRATASE DERIVED FROM *BREVIBACTERIUM FLAVUM* MJ233

(A) EXTRACTION OF THE ENTIRE DNA OF *BREVIBACTERIUM FLAVUM* MJ233

In one liter of semi-synthetic culture medium A, *Brevibacterium flavum* MJ233 (FERM BP-1497) was incubated until it reached the last-half phase of the logarithmic growth period to collect colonies therefrom, wherein the culture medium A had a composition comprising: 2 g of urea; 7 g of $(\text{H}_4\text{N})_2\text{SO}_4$; 0.5 g of K_2HPO_4 ; 0.5 g of KH_2PO_4 ; 0.5 g of MgSO_4 ; 6 mg of $\text{FeSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$; 6 mg of $\text{MnSO}_4(4\sim 6\text{H}_2\text{O})$; 2.5 g of yeast extract; 5 g of casamino acid; 200 μg of biotin; 200 μg of thiamine hydrochloride; 20 g of glucose; and 1 liter of distilled water. The colonies thus obtained were next suspended in 15 mL of 10 mM NaCl – 20mM tris buffer (pH 8.0) – 1mM Na_2EDTA solution at a concentration of 10 mg/mL containing lysozyme. Next, proteinase K was added to give a final concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and the medium was kept at 37 °C for one hour. Sodium dodecyl sulfate was added thereto to further give a final concentration of 0.5% and the medium was kept at 50 °C for 6 hours to cause bacteriolysis therein. To the bacteriolysed solution, an equal volume of a phenol/chloroform solution was added and the medium was gently shaken for 10 minutes at room temperature. Then, the entire amount of the bacteriolysed solution was centrifuged at 5,000 g for 20 minutes at 10~12 °C. The supernatant fraction was separated and sodium acetate was added thereto to give a molarity of 0.3M. Then, a 2-fold amount of ethanol was slowly added thereto. The DNA that was present between the aqueous layer and ethanol layer was rolled up around a glass rod, and then, washed with a 70% ethanol and dried. A 5 mL volume of the 10mM tris buffer (pH 7.5)-1mM Na_2EDTA solution was added to the DNA thus obtained. The mixture was allowed to stand overnight at 4 °C for use in the following experiments.

0038

(B) RECOMBINANT DNA PRODUCTION

Ninety liters of the total DNA solution of *Brevibacterium flavum* MJ233 obtained in Section (A) above was completely digested with 50 units of KpnI restriction enzyme at 37 °C for one hour. The DNA that was digested with KpnI was mixed with the fragments prepared by cutting the cloning vector pUC118, which is sold by Takara Shuzo Co., Ltd., with KpnI restriction enzyme. Both components, 50mM of pH 7.6 tris buffer, 10mM dithiothreitol, 1mM ATP, 10mM MgCl_2 , and one unit of T4 DNA ligase were added to

the mixture and this was allowed to react at 4 °C for 15 hours to ligate the vector wherein the concentration of each component is the final concentration herein.

0039

(C) SELECTION OF PLASMIDS CONTAINING THE GENE ENCODING FOR DIHYDROXY-ACID DEHYDRATASE

The above gene was selected by utilizing the mutant strain *Escherichia coli* ME 5361. The *Escherichia coli* ME 5361 was then transformed with the plasmid in the solution obtained in Section (B) above by the sodium chloride method as described in the Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970. The mixture was inoculated into a selective medium containing 50 mg of ampicillin wherein the selective medium contained 7 g of K_2HPO_4 ; 2 g of KH_2PO_4 ; 1 g of $(NH_4)_2SO_4$; 0.1 g of $MgSO_4(7H_2O)$; 20 g of glucose; 20 mg of leucine; 1 mg of thiamine; 16 g of agar; and 1 liter of distilled water.

0040

The strain [sic, colonies] grown on this medium was incubated by a normal method and the plasmid DNA was extracted therefrom. The plasmids were cut with KpnI restriction enzyme and analyzed by the agarose-gel electrophoresis. It was confirmed that a DNA insert of about 6.0 kb was present in the plasmid in addition to the DNA fragment of the pUC 118 of about 3.2 kb.

0041

EMBODIMENT 2

DETERMINATION OF THE BASE SEQUENCE OF THE GENE ENCODING FOR DIHYDROXY-ACID DEHYDRATASE

The base sequence of the DNA fragment of about 6.0 kb containing the gene encoding dihydroxy-acid dehydratase obtained in Section (C) of Embodiment 1 was determined by the dideoxy chain termination method in which pUC 118 and pUC 119 plasmids were utilized in accordance with the strategic [sic, restriction] map as shown in Figure 1, wherein the dideoxy chain termination method was disclosed by Sanger, F. et al., in the Proceedings of National Academy of Science USA, 74, 5453, 1977.

0042

The gene encoding dihydroxy-acid dehydratase was determined by utilizing the open reading frame, which is present in a DNA [strand]: The gene was configured with

1836 base pairs that encode 612 amino acids having the base sequence expressed by Sequence Number 1 of the sequence table described later.

0043

EMBODIMENT 3

PRODUCTION OF pCRY30 PLASMID VECTOR BEING STABLE AND CAPABLE OF REPLICATING IN CORYNEFORM BACTERIA

[(A)] PREPARATION OF pBY 503 PLASMID

The pBY 503 plasmid having a molecular weight of about 10 megadalton was isolated from *Brevibacterium stationis* IFO 12144 (FERM BP-2515), which was prepared by the method described in Japanese unexamined patent application publication No. H01-095785.

0044

The cells of *Brevibacterium stationis* IFO 12144 were collected by incubating a semi-synthesized culture medium until the cell growth reach the last-half phase of the logarithmic growth period in 1 liter of culture medium A, wherein the culture medium A contained 2 g of urea; 7 g of $(\text{H}_4\text{N})_2\text{SO}_4$; 0.5 g of K_2HPO_4 ; 0.5 g of KH_2PO_4 ; 0.5 g of MgSO_4 ; 6 mg of $\text{FeSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$; 6 mg of $\text{MnSO}_4(4\sim 6\text{H}_2\text{O})$; 2.5 g of yeast extract; 5 g of casamino acid; 200 μg of biotin; 200 μg of thiamine hydrochloride; 20 g of glucose; and 1 liter of distilled water. The colonies thus obtained were then suspended in 20 mL of buffer containing lysozyme at a concentration of 10 mg/mL and allowed to react at 37 °C for one hour, wherein the buffer contained 25 mM of tris (hydroxymethyl) amino methane; 10 mM of EDTA; and 50 mM of glucose. A 40 mL portion of the SDS solution containing 0.2N NaOH and 1% (w/v) SDS was added to the reaction solution. The mixture was then gently mixed and allowed to stand at a room temperature for 15 minutes. Next, 30 mL of potassium acetate solution was added to the reaction mixture and the contents were thoroughly mixed. The mixture was then allowed to stand in an ice bath for 15 minutes, wherein the potassium acetate solution was a mixture of 60 mL of 5M potassium acetate solution, 11.5 mL of acetic acid, and 28.5 mL of distilled water.

0045

The entire amount of the bacteriolysed solution was transferred to a centrifuge tube and was centrifuged at 15,000 g for 10 minutes at 4 °C to obtain the supernatant. An

equal volume of a phenol chloroform solution (phenol/chloroform = 1:1) was added to suspend the supernatant. This suspension was transferred to a centrifuge tube and centrifuged at 15,000 g at room temperature for 5 minutes, after which the aqueous layer was collected. A 2-fold amount of ethanol was added to the aqueous layer and the mixture was allowed to stand at -20 °C for one hour, and was then centrifuged at 4 °C for 10 minutes at 15,000 g. The resulting precipitate [sic, sediment] was collected.

0046

The precipitates [sic, sediments] were vacuum dried and dissolved into 2 mL of TE buffer, wherein the TE buffer was a mixture of 10mM tris and 1mM of EDTA, and was adjusted to pH 8.0 by addition of HCl. A 15 mL portion of cesium chloride solution and 1mL of a 10 mg/mL ethidium bromide solution were added to the mixture to give a density of 1.392 g/mL, wherein the cesium chloride solution was prepared by dissolving 170 g of cesium chloride into 100 mL of the TE buffer of 5-fold concentrations. The resulting solution was centrifuged at 116,000 g at 12 °C for 42 hours.

0047

The pBY503 plasmid can be identified as a lower band in the centrifuge tube upon irradiation of UV light. The fraction containing the pBY 503 plasmid was obtained by taking the band by a syringe through the side surface of the centrifuge tube. Then, this fraction was treated 4 times with an equal volume of isoamyl alcohol to remove the ethidium bromide by extraction. The residual fraction was dialyzed against the TE buffer. A 3M sodium acetate solution was added to the dialyzed solution containing the pBY503 plasmid thus obtained to give a final concentration of 30mM. Then, a 2-fold amount of ethanol was added to the solution and the mixture was allowed to stand at -20 °C for one hour. The solution was centrifuged at 15,000 g to cause DNA sedimentation, and 50 µg of the pBY plasmid was thus obtained.

0048

(B) PRODUCTION OF pCRY30 PLASMID VECTOR

Five units of Sal I restriction enzyme was allowed to react with 0.5 µg of the pHSG298 plasmid manufactured by Takara Shuzo Co., Ltd at 37 °C for one hour to completely digest the plasmid DNA. Next, 1 unit of the XhoI restriction enzyme was

allowed to react with 2 µg of the pBY503 plasmid at 37 °C for 30 minutes to partially digest the plasmid DNA.

0049

Both of the DNA cleavage products were mixed and heated at 65 °C for 10 minutes to inactivate the restriction enzymes. Then, each component was enhanced in the inactive solution to give a final concentration of 50 mM of pH 7.6 tris buffer; 10 mM in MgCl₂; 10mM in dithiothreitol; 1 mM for ATP; and 1 unit for T4 DNA ligase. The solution was kept at 16 °C for 15 hours. The *Escherichia coli* JM 109 competent cell manufactured by Takara Shuzo Co., Ltd. was transformed utilizing this solution.

0050

The recombinant strain was incubated in the L culture medium at 37 °C for 24 hours to obtain a viable strain, wherein the L-culture medium contained kanamycin at a final concentration of 30 µg/mL; IPTG (isopropyl-β-D-galactopyranoside) at the final concentration of 100 µg/mL; X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside). Among these viable strains, those that grew in white colonies were selected, and each plasmid was extracted by the alkali-SDS [gel-electrophoresis] (See T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, Molecular Cloning, 90-91, 1982).

0051

As a result, the pHSG298-ori plasmid was obtained, in which a fragment of about 4.0 kb derived from the pBY 503 was inserted to the Sall site of the pHSG298 plasmid. Now, using the same method previously described, the DNA fragment of about 2.1 kb was cloned between the KpnI and EcoRI sites of the pHSG298-ori plasmid, wherein the DNA fragment was obtained by digesting the pBY503 DNA prepared in Section (A) with KpnI and EcoRI restriction enzymes. The pCRY30 plasmid vector was thus prepared.

0052

PRODUCTION OF PLASMID pCRY 30-DH AND INTRODUCTION THEREOF INTO CORYNEFORM BACTERIUM

Five micrograms of the plasmid obtained in Section (C) of Embodiment 1 that contains the gene encoding dehydroxy-acid dehydratase was digested with 5 units of the KpnI restriction enzyme at 37 °C for one hour. A 1 µg portion of the pCRY 30 plasmid obtained in Section (B) of Embodiment 3 was digested with 1 unit of the KpnII

restriction enzyme at 37 °C for one hour. The above two plasmids were mixed together, and 50 mM pH 7.6 tris buffer, 10 mM of dithiothreitol, 1 mM of ATP, 10 mM of MgCl₂, and 1 unit of T4 DNA ligase was added to the mixture to ligate the plasmid vector [pCRY30] by reaction at 12 °C for 15 hours. The *Escherichia coli* ME 5361 strain was transformed by the above method utilizing the plasmid thus obtained and was inoculated into a selective culture medium containing 50g /mL of kanamycin, wherein this selective culture medium was prepared by dissolving 7 g of K₂HPO₄; 1 g of (NH₄)₂SO₄; 0.1 g of MgSO₄(7H₂O); 20 g of glucose; 20 mg of leucine, 1 mg of thiamine, and 16 g of agar into 1 liter of distilled water.

0053

The strain grown in the liquid medium was incubated by a normal method. The plasmid DNA was extracted from the liquid medium, cut with a restriction enzyme, and analyzed by agarose-gel electrophoresis. It was confirmed that a DNA insert of 6.0 kb was present in the plasmid DNA, in addition to the DNA fragment of the pCRY 30 plasmid of 8.6 kb.

0054

The plasmid DNA thus prepared was transformed into a Coryneform bacterium by electric pulsation. The *Brevibacterium flavum* MJ233 (FERM BP-1497) without the pBY 502 plasmid the medium A was incubated until the cell growth reached the last half of the logarithmic growth. Penicillin G was added thereto to give a concentration of 1 unit/mL and the medium A was further incubated for 2 hours. The cells were centrifuged, collected, and washed with 20 mL of the pulsation solution, which is a mixture of 272 mM of sucrose, 7mM of KH₂PO₄, and 1mM of MgCl₂ at pH 7.4. The cells [sic, sediments] were further centrifuged and suspended with 5 mL of the pulsation solution. A 0.75 mL portion of the cells [sic, sediments] and 50 µL of the DNA plasmid solution were mixed and allowed to stand in a water bath for 20 minutes. Electric pulsation was applied to the mixture with a Gene Pulser manufactured by Biorad Laboratories at 2500 volts and 25 µFD. Then, the mixture was allowed to stand in an ice bath for 20 minutes. The entire amount of the mixture was transferred to 3 mL of the medium A, which was then incubated at 30 °C for one hour. Next, the mixture was inoculated into agar culture A containing kanamycin at the final concentration of 15 µg/mL and incubated at 30 °C

for 2~3 days. These plasmids were selected for the kanamycin resistant strains [sic, colonies] in the manner described in Section (A) of Embodiment 3.

These plasmids were then cut with various restriction enzymes to measure the sizes of the fragments thereof. The results are shown in Table 2 below.

0055

TABLE 2 PLASMID pCRY 30-DH

Restriction Enzyme	No. of Recognition Sites	Fragment Size (kb)
EcoRI	3	8.2, 4.4, 2.0
BamHI	1	14.6
KpnI	2	8.6, 6.0

The plasmid characterized by the above restriction enzyme is named as “pCRY-30DH”.

0056

EMBODIMENT 5 CONFIRMATION OF ISOLEUCINE PRODUCTION

The *Brevibacterium flavum* MJ233 strain being transformed with the pCRY30-DH plasmid in Embodiment 4 was inoculated into 10 mL of the medium A with a loop wherein 2% ethanol was added to the medium A in place of glucose. The medium A was then incubated (pre-incubated) at 30~33 °C for 12~16 hours while being shaken. Then, 2% of the pre-incubated medium was inoculated into 100 mL of the medium A wherein 2% ethanol was added to the medium A in place of glucose. Then, the medium A was incubated at 33 °C for 16 hours until the cell growth reached the last half-phase of the logarithmic growth. The liquid culture medium was then centrifuged at 3,500 g for 15 minutes. The cells [sec, sediments] were collected and washed once with the reaction solution described below.

0057

The sediment was suspended with the reaction solution to give a concentration of 0.5 g/mL. A volume of glass beads equal to that of the cells was added to the suspension and the cells were lysed with ultrasound four times in an ice bath for 2.5 minutes each time at a power level of 6 with 50% pulsation. The lysate was centrifuged at 8,000 rpm for 60 minutes. The supernatant was used as a liquid crude enzyme. A 500 µL portion of

the liquid crude enzyme and 500 μ L of the reaction mixture having the composition shown below were mixed and allowed to react with each other at 33 °C for 2.5 hours.

0058

TABLE 3 REACTION SOLUTION

100mM	Potassium phosphate buffer (pH 7.2)
100mM	Sodium pyruvic acid
50mM	α -Ketobutyrate
100mM	Sodium L-glutamate
100mM	Nicotinamide adenine dinucleotide
23 g/L	Ammonium sulfate
0.2mM	Thiamine diphosphate
10 mg/L	Flavine adenine dinucleotide
0.25mM	Pyridoxal 5'-phosphate
10mM	Magnesium chloride

0059

After 2.5 hours, the reaction was terminated by heating at 100 °C for 2 minutes. The reaction mixture was centrifuged at 12,000 g for 15 minutes and the amount of isoleucine produced or contained in the supernatant was analyzed by thin layer chromatography. In the same manner, the amount of isoleucine produced in the wild strain of *Brevibacterium flavum* MJ233 was also analyzed. The results are shown in Table 4.

0060

TABLE 4 AMOUNT OF ISOLEUCINE PRODUCED

Recombinant strain	20mM
Wild strain	10mM

0061

ADVANTAGEOUS EFFECTS OF THE INVENTION

The use of the DNA fragment of the present invention having the gene encoding for dihydroxy-acid dehydratase in breeding Coryneform bacteria provides a strain that can produce dihydroxy-acid dehydratase or isoleucine and valine in a highly efficient manner.

0062

SEQUENCE TABLE

Sequence Number: 1

Sequence Length: 1836

Sequence of: Nucleic Acid

No. of Strand: Double strand

Topology: linear

Type of DNA: Genomic DNA

Origin

Name: *Brevibacterium flavum*

Strain Name: MJ233

Sequence Characteristics:

Symbol of Characteristic: CDS

Location: 1-1836

Method Used to Determine the Characteristic: E

SEQUENCE

```

ATG ATC CCA CTT CGT TCA AAA GTC ACC ACC GTC GGT CGC AAT GCA GCT 48
Met Ile Pro Leu Arg Ser Lys Val Thr Thr Val Gly Arg Asn Ala Ala
1      5      10      15
GGC GCT CGC GCC CTT TGG CGT GCC ACC GGC ACA AAG GAA AAT GAG TTC 96
Gly Ala Arg Ala Leu Trp Arg Ala Thr Gly Thr Lys Glu Asn Glu Phe
20      25      30
GGC AAG CCA ATT GTT GCC ATC GTG AAC TOC TAC ACC CAG TTC GTG CCC 144
Gly Lys Pro Ile Val Ala Ile Val Asn Ser Tyr Thr Gln Phe Val Pro
35      40      45
GGA CAC GTT CAC CTT AAG AAC GTC GGC GAT ATT GTG GCA GAT GCA GTG 192
Gly His Val His Leu Lys Asn Val Gly Asp Ile Val Ala Asp Ala Val
50      55      60
CGC AAA GCC GGT GGC GTT CCA AAA GAA TTC AAC ACC ATC GCC GTC GAT 240
Arg Lys Ala Gly Gly Val Pro Lys Glu Phe Asn Thr Ile Ala Val Asp
65      70      75      80
GAC GGC ATC GCC ATG GGA CAC GGC GGC ATG CTG TAC TOC CTG CCA TOC 288
Asp Gly Ile Ala Met Gly His Gly Gly Met Leu Tyr Ser Leu Pro Ser
85      90      95
CGT GAA ATC ATC GCC GAC TOC GTC GAA TAC ATG GTC AAC GCA CAC ACC 336
Arg Glu Ile Ile Ala Asp Ser Val Glu Tyr Met Val Asn Ala His Thr
100      105      110
GCC GAC GCC ATG GTG TGT ATC TOC AAC TGT GAC AAG ATC ACC CCA GGC 384
Ala Asp Ala Met Val Cys Ile Ser Asn Cys Asp Lys Ile Thr Pro Gly
115      120      125
ATG CTC AAC GCA GCA ATG CGC CTG AAC ATC CCA GTG GTC TTC GTT TOC 432
Met Leu Asn Ala Ala Met Arg Leu Asn Ile Pro Val Val Phe Val Ser
130      135      140
GGT GGC CCA ATG GAA GCT GGC AAG GCT GTC GTC GTT GAC GGC GTT GCA 480
Gly Gly Pro Met Glu Ala Gly Lys Ala Val Val Val Asp Gly Val Ala
145      150      155      160
CAC GCA CCA ACC GAC CTC ATC ACC GCG ATC TOC GCA TOC GCA AGC GAT 528
His Ala Pro Thr Asp Leu Ile Thr Ala Ile Ser Ala Ser Ala Ser Asp
165      170      175
GCA GTC GAC GAC GCA GGC CTT GCA GCC GTT GAA GCA TOC GCA TOC CCA 576
Ala Val Asp Asp Ala Gly Leu Ala Ala Val Glu Ala Ser Ala Cys Pro
180      185      190
ACC TGT GGC TOC TGC TOC GGT ATG TTC ACC GCG AAC TOC ATG AAC TGC 624
Thr Cys Gly Ser Cys Ser Gly Met Phe Thr Ala Asn Ser Met Asn Cys
195      200      205

```

CTC ACC GAA GCT CTG GGA CTT TCT CTC CCA GGC AAC GGC TCC AOC CTG 672
 Leu Thr Glu Ala Leu Gly Leu Ser Leu Pro Gly Asn Gly Ser Thr Leu
 210 215 220
 GCA ACC CAC GCA GCA CGT CGC GCA CTG TTT GAA AAG GGC GGC GAA ACC 720
 Ala Thr His Ala Ala Arg Arg Ala Leu Phe Glu Lys Ala Gly Glu Thr
 225 230 235 240
 GTC GTT GAA CTG TGC CGC CGC TAC TAC GGT GAA GAA GAC GAA TCC GTT 768
 Val Val Glu Leu Cys Arg Arg Tyr Tyr Gly Glu Glu Asp Glu Ser Val
 245 250 255
 CTG CCA CGT GGC ATT GOC ACC AAG AAG GCA TTC GAA AAC GCA ATG GCA 816
 Leu Pro Arg Gly Ile Ala Thr Lys Lys Ala Phe Glu Asn Ala Met Ala
 260 265 270
 CTG GAT ATG GCC ATG GGT GGA TCC AOC AAC AOC ATC CTC CAC ATC CTC 864
 Leu Asp Met Ala Met Gly Gly Ser Thr Asn Thr Ile Leu His Ile Leu
 275 280 285
 GCA GCT GCC CAG GAA GGC GAA GTT GAC TTC GAC CTC GCA GAC ATC GAC 912
 Ala Ala Ala Gln Glu Gly Glu Val Asp Phe Asp Leu Ala Asp Ile Asp
 290 295 300
 GAA CTG TCC AAA AAC GTC CCC TGC CTG TCC AAG GTT GCA CCA AAC TCC 960
 Glu Leu Ser Lys Asn Val Pro Cys Leu Ser Lys Val Ala Pro Asn Ser
 305 310 315 320
 GAC TAC CAC ATG GAA GAC GTC CAC CGC GGC GGT GGC ATT CCA CCA CTG 1008
 Asp Tyr His Met Glu Asp Val His Arg Ala Gly Gly Ile Pro Ala Leu
 325 330 335
 CTC GGC GAG CTC AAC CGC GGT GGC CTG CTG AAT AAG GAC GTC CAC TCC 1056
 Leu Gly Glu Leu Asn Arg Gly Gly Leu Leu Asn Lys Asp Val His Ser
 340 345 350
 GTT CAC TCC AAC GAC CTT GAA GGT TGG TTG GAT GAC TGG GAT ATC CGC 1104
 Val His Ser Asn Asp Leu Glu Gly Trp Leu Asp Asp Trp Asp Ile Arg
 355 360 365
 TCT GGC AAG ACC ACC GAA GTA GCA ACC GAA CTC TTC CAC GCA GGC CCA 1152
 Ser Gly Lys Thr Thr Glu Val Ala Thr Glu Leu Phe His Ala Ala Pro
 370 375 380
 GGT GGC ATC CGC ACC ACC GAA GCA TTC TCC AOC GAG AAC CGC TGG GAC 1200
 Gly Gly Ile Arg Thr Thr Glu Ala Phe Ser Thr Glu Asn Arg Trp Asp
 385 390 395 400
 GAA CTC GAC ACC GAC GCT GGC AAG GGC TGC ATC CGC GAC GTT GAA CAC 1248
 Glu Leu Asp Thr Asp Ala Ala Lys Gly Cys Ile Arg Asp Val Glu His
 405 410 415
 GGC TAC ACC GAC GGC GGC CTG GTT GTT CTT CGC GGC AAC ATC TCC OCT 1296
 Ala Tyr Thr Asp Gly Gly Leu Val Val Leu Arg Gly Asn Ile Ser Pro
 420 425 430
 GAC GGC GCA GTG ATC AAG TCC GCA GGT ATC GAA GAA GAG CTG TGG AAC 1344
 Asp Gly Ala Val Ile Lys Ser Ala Gly Ile Glu Glu Glu Leu Trp Asn
 435 440 445
 TTC ACC GGA CCA GCA CGA GTT GTC GAA AGC CAG GAA GAG GCA GTC TCT 1392
 Phe Thr Gly Pro Ala Arg Val Val Glu Ser Gln Glu Glu Ala Val Ser
 450 455 460
 GTC ATC CTG ACC AAG AOC ATC CAA GCT GGC GAA GTT CTG GTC GTC CGC 1440
 Val Ile Leu Thr Lys Thr Ile Gln Ala Gly Glu Val Leu Val Val Arg

```

465          470          475          480
TAC GAA GGC CCA TCA GGT GGA CCA GGC ATG CAG GAA ATG CTT CAC CCA 1488
Tyr Glu Gly Pro Ser Gly Gly Pro Gly Met Gln Glu Met Leu His Pro
          485          490          495
ACC GCA TTC CTC AAG GGA TCC GGC CTG GGC AAG AAG TGT GCA CTG ATC 1536
Thr Ala Phe Leu Lys Gly Ser Gly Leu Gly Lys Lys Cys Ala Leu Ile
          500          505          510
ACC GAC GGC CGT TTC TCC GGA GGT TCC TCA GGA CTG TCC ATC GGC CAC 1584
Thr Asp Gly Arg Phe Ser Gly Gly Ser Ser Gly Leu Ser Ile Gly His
          515          520          525
GTC TCC CCA GAA GCA GCA CAC GGC GGA GTC ATT GGT CTG ATC GAA AAC 1632
Val Ser Pro Glu Ala Ala His Gly Gly Val Ile Gly Leu Ile Glu Asn
          530          535          540
GGC GAC ATC GTT TCC ATC GAC GTT CAC AAC CGC AAG CTC GAA GTT CAG 1680
Gly Asp Ile Val Ser Ile Asp Val His Asn Arg Lys Leu Glu Val Gln
          545          550          555          560
GTC TCC AAC GAG GAA CTC CAG CGC CGC CGC GAC GCT ATG AAC GCC TCC 1728
Val Ser Asn Glu Glu Leu Gln Arg Arg Arg Asp Ala Met Asn Ala Ser
          565          570          575
GAG AAG CCA TGG CAG CCA GTC AAC CGT AAC CGC GTT GTC ACC AAG GCA 1776
Glu Lys Pro Trp Gln Pro Val Asn Arg Asn Arg Val Val Thr Lys Ala
          580          585          590
CTG CGC GCA TAC GCA AAG ATG GCT ACC TCC GCT GAT AAG GGT GCA GTC 1824
Leu Arg Ala Tyr Ala Lys Met Ala Thr Ser Ala Asp Lys Gly Ala Val
          595          600          605
CGT CAG GTC GAC
Arg Gln Val Asp
          610          612

```

0063

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 is the restriction map of the DNA [typo, the original text reads "1NA"] fragment (fragment A) of the present invention containing the gene encoding dihydroxy-acid dehydratase of about 6.0 kb.

FIGURE 1

